Fatemeh Mansouri[1,2*] ID

[1] *Department of Genetics and Immunology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

A Review of Stem Cell Technology

Received: 29 Nov. 2016 ; Accepted: 31 Dec. 2017

Abstract

Stem cells as natural cells exist in embryonic and adult tissues. Recent studies have begun to prove the strong and powerful role of stem cells in the field of treatment. Stem cells have the potential for self-renewal and differentiation into specific types of somatic cells. Their ability to produce new cells in medicine, drug discovery, cell therapy and research is very important. In the past decades, many efforts have been made to find safe, low-cost methods and progress stem cell culture. The purpose of this review article is to: 1) explain the application of stem cells in medicine, drug discovery, modeling of disease and toxicology studies. 2) A summary of recent advances in stem cell technology, the advantages and disadvantages of the most commonly used culture methods.
The result of this discussion shows that the use of new culture methods can be effective in the optimal use of stem cells.

Keywords *:* Stem cells Technology, Medicine, Drug discovery

***Corresponding Author:**
Department of Genetics and Immunology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tel: 09123704153
E-mail: mansouri1600@hotmail.com

مروری بر تکنولوژی سلول‌های بنیادی

فاطمه منصوری[۱و۲] ID

[۱] گروه ژنتیک و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۹/۹ ؛ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۰/۱۰

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌های طبیعی در بافت‌های جنینی و بالغین وجود دارند. مطالعات اخیر در جهت اثبات نقش قوی و قدرتمند سلول‌های بنیادی در زمینه درمان آغاز شده است. سلول‌های بنیادی پتانسیل خود تجدیدسازی و تمایز به انواع خاص سلول‌های سوماتیک را دارند. توانایی آنها برای تولید سلول‌های جدید در پزشکی، کشف دارو، سلول درمانی و تحقیقات بسیار مهم است. در دهه‌های گذشته تلاش‌های بسیار زیادی در جهت یافتن متدهای امن، کم هزینه و پیشرفته کشت سلول‌های بنیادی انجام شده است. هدف از این مقاله مروری: ۱) توضیح کاربرد سلول‌های بنیادی در پزشکی، کشف دارو، الگوی‌برداری از بیماری‌ها و مطالعات سم شناسی است. ۲) تهیه خلاصه ای از پیشرفت‌های اخیر تکنولوژی سلول‌های بنیادی، مزیت‌ها و معایب متدهای رایج کشت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتیجه این بحث نشان می‌دهد که استفاده از روش‌های کشت جدید میتواند برای استفاده بهینه سلول‌های بنیادی موثر باشد.

کلمات کلیدی: تکنولوژی سلول‌های بنیادی، پزشکی، کشف دارو

*نویسنده مسئول:
گروه ژنتیک و ایمونولوژی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۰۹۱۲۳۷۰۴۱۵۳
E-mail: mansouri1600@hotmail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های طبیعی هستند که قابلیت تکثیر، تولید و تمایز به انواع سلول‌های سوماتیک در محیط آزمایشگاه و در بدن موجود زنده را دارند. در داخل بدن سلول‌های بنیادی مختلفی وجود دارد و در ارگانیسم‌های بالغ در هموستاز و ترمیم نقش دارند.[۱] سلول‌های بنیادی طبیعی قابلیت فوق العاده ای برای تکثیر و تمایز به انواع سلول‌های بالغ را دارند. توانایی نامحدود آنها در تولید سلول‌های فیزیولوژیک باعث شده است آنها جایگزین سلول‌های نوترکیب یا پرایمری شوند.[۲] اما هزینه‌ها و مشکلات تکنیکی و نحوه هدایت آنها به سلول‌های مورد نظر مشکلاتی دارد که باید برطرف شود.

چندین بافت مانند مغز استخوان، پوست، پالپ دندان و مغز منبعی از سلول‌های بنیادی هستند.[۳] وقتی یک سلول بنیادی از جایگاه اصلی خود (Nich) برداشته می‌شود، شروع به تمایز می‌کند. یک نیچ تمام فاکتورهای اساسی مانند فاکتورهای رشد، ماتریکس خارج سلولی و تعاملات بین سلولی را فراهم می‌نماید.[۴و۵] سلول‌های بنیادی انواع مختلفی دارند. این سلول‌ها از نظر طول عمر در محیط کشت و ایجاد انواع مختلف سلول‌های سوماتیک با هم فرق دارند.[۶] سلول‌های بنیادی یا استم سل‌ها در مراحل کشف دارو، شناسایی هدفمند داروها و مطالعات سم شناسی و مهندسی بافت می‌توانند انقلاب عظیمی ایجاد کنند.[۷]

ما در این مقاله به طور اجمالی پیشرفت‌های اخیر سلول‌های بنیادی و روش‌های تازه و تکنیک‌های جدیدی را که در حال حاضر می‌توانند بصورت گسترده در پزشکی و داروسازی بکار گرفته شوند بررسی کرده ایم.

سلول‌های بنیادی

مهمترین سلول‌های بنیادی پرتوان (pluripotent)، سلول‌های جنینی یا سلول‌های القایی هستند که قابلیت تولید خودشان و انواع سلول‌های بالغ سوماتیک را دارند.[۸] اما سلول‌های بنیادی بالغین محدودیت‌هایی در قدرت تمایز دارند. اگر این سلول‌ها بتوانند سلول‌های مختلف یک بافت را تولید کنند چند توان یا (multipotent) هستند، برای مثال سلول‌های هماتوپویتیک قادرند فقط سلول‌های خونی را بسازند.

این توانایی سلول‌های بنیادی در جهت تولید سلول‌های فیزیولوژیک مانند هپاتوسیت، کاردیومیوسیت و نرونها علوم مختلف پزشکی را تحریک به مطالعه برای تحقیق در این زمینه کرده است. برای مثال در زمینه‌هایی چون درمان‌های جایگزین سلولی، کشف داروها، شبیه سازی بیماریها، مطالعات سم شناسی و غیره.[۹و۱۰] پیوند مغز استخوان که چهل سال است انجام می‌شود از جمله این کارها می‌باشد.[۱۱و۱۲]

سلول‌های بنیادی خونی یا (Hematopoietic Stem Cell=HSC) به میزان کمی در خون وجود دارند اما توانایی باز سازی یک سیستم خونی را به طور کامل دارند. اخیرا سلول‌های بنیادی در درمان برخی بیماری‌ها استفاده می‌شوند. مثلا از سلول‌های بنیادی نرون جنینی برای درمان آسیب‌های نخاعی و یا سلول‌های بنیادی نورون بالغین برای تولید سلول‌های عصبی- مغزی در سکته‌های مغزی بکار گرفته می‌شود.[۸و۱۳] اما مشکلات عمده ای مانند هزینه تولید بسیار بالا و پیچیدگی‌های تکنیکی در تکثیر سلول وجود دارد.[۹و۱۱]

به علاوه استفاده از سلول‌های بنیادی در جهت اهداف درمانی خطر سلول‌های غیر متمایز شده و ایجاد سلول سرطانی را به همراه دارد.[۱۱] راه جایگزین برای اینکار تولید داروی شناخته شده از سلول‌های بنیادی می‌باشد.[۱۴] حوزه ایجاد شده در مورد سلول‌های پر توان القایی جنبه دیگری است که می‌توان از سلول‌های بنیادی در درمان مخصوص هر بیماری استفاده نمود.[۱۵] همچنین تولید پانلی از سلول‌های بنیادی با چندین نوع فنوتیپ ژنتیکی امکان پیش بینی تاثیر دارو در یک جمعیت را فراهم می‌نماید.[۱۶] کاربرد جالب دیگر در مورد سلول‌های بنیادی تولید داروهایی از سلول‌های بنیادی است که می‌توانند باعث تولید و بوجود آوردن سلول‌های از دست رفته در قلب یا مغز و اعصاب شوند و قادرند سلول‌های قلبی یا عصبی را تحریک به تولید سلول‌های مشابه کنند.[۱۲و۱۷]

انواع سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی پرتوان مهمترین سلول‌های بنیادی هستند که خاصیت از نو ساختن خود و توانایی تمایز به انواع سلول‌های سوماتیک را در محیط *In vitro* و *In vivo* دارند مانند سلول‌های

خونی، عصبی، پانکراس و قلب.

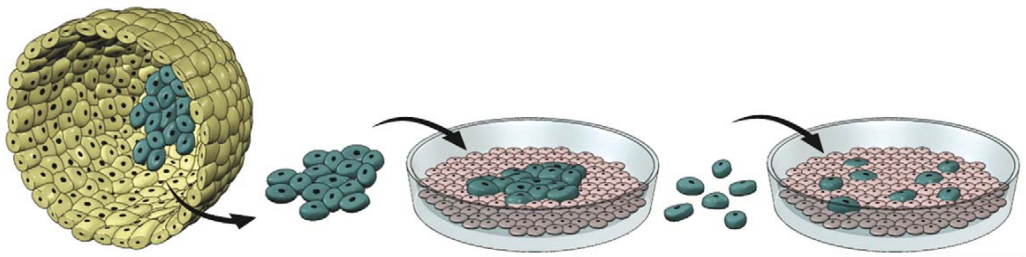
دو نوع سلول بنیادی وجود دارد: سلول‌های بنیادی جنینی یا (Embryonic Stem Cells=ESC)که از سلول‌های لایه داخلی توده جنین قبل از لانه گزینی گرفته شده است و در ابتدا از موش و سپس از سایر گونه‌ها مثل رت، انسان و میمون جدا شده اند.[۱۸] سلول‌های بنیادی جنینی مشتق شده از انسان به عنوان Pluripotent شناخته شده اند به این معنی که می‌توانند تمام انواع مختلف سلول‌ها را در بدن ایجاد کنند.[۸] سلول‌های پر توان القایی (Induced Pluripotent Stem Cell=IPS) با برنامه ریزی مجدد روی سلول‌های سوماتیک بالغین و تبدیل‌شان به استم سل‌ها ایجاد می‌شوند. این تکنولوژی برنامه ریزی مجدد روی سلول‌های سوماتیک، ابتدا در موش و سپس در سلول‌های انسانی انجام شده است.[۱۶] این سلول‌ها تعداد کمی دارند و اغلب در قسمتهای عمقی بافت وجود دارند که بدین طریق شناسایی، جداسازی و رشد آنها در محیط آزمایشگاهی قدری مشکل است.

سلول‌های جنینی انسانی (Human Embryonic Stem Cell=HES) در مراحل اولیه یعنی در ۴ یا ۵ روز پس از لقاح، از بلاستوسیت‌ها جدا شده اند که توانایی نامحدودی برای خود تجدید سازی (Self-renewal) دارند. سلول‌های بنیادی جنینی چند توان(Multipotent) هستند و از بافت‌های جنینی یا عروق بند ناف بدست می آیند.[۸]

در مرحله اول هضم پروتئولیتیک زوناپلوسیدا از یک بلاستوسیت برای حذف تروفواکتودرم با آنتی بادی انجام می‌شود و توده سلول‌های داخلی جدا می‌شود که شامل ۳۰ عدد سلول است که روی یک لایه تغذیه کننده (Feeder layer) از سلول‌های فیبروبلاستی که تقسیمات میتوزی آنها منع شده کشت داده می‌شوند.[۱۹] پس از یک تا دو هفته، رشد سلول‌ها بیشتر شده و به ظرف محیط کشت جدید منتقل می‌شوند که همراه با ظهور کلنی سلول‌های متمایز نشده است.[۱۹] لایه تغذیه کننده فاکتورهای خاصی را برای رشد HES فراهم می‌آورد. ادامه روند جدا سازی و کشت این سلول‌ها با چند روش امکان پذیر است (شکل ۱).

در روش دستی ریز جدا سازی یا (Manual Microdissection) از میکروپیپت‌های ظریف مخصوص برای جدا سازی کلنی‌های HES و کشت آنها به پلیت‌های جدید استفاده می‌شود. مزیت این روش طوری است که میتوان سلول‌های متمایز شده را از سلول‌های متمایز نشده جدا کرد. البته این روش بسیار وقت گیر است.

روش دیگر روش آنزیمی است که سریعتر از روش قبلی انجام می‌شود و آنزیمهایی مانند کلاژناز (Collagenase IV) ، تریپسین (Trypsin) ، دیسپاز (Dispase) و تریپل(Triple) برای جدا سازی و پاساژ استفاده می‌شود.[۱۱] استفاده از روش آنزیمی احتمال افزایش تغییرات ژنتیکی در طول پاساژ را بیشتر می‌کند. لذا اخیرا از روش‌های آنزیمی با یک منع کننده سنتیتیک استفاده می‌شود که نتیجه آن بقای بیشتر سلول‌ها در پاساژهای متوالی است. برای حذف لایه تغذیه کننده امروزه از ماده مناسب دیگر برای رشد به نام Matrigel استفاده می‌شود.[۱۱]



شکل ۱: جدا سازی سلول‌های بنیادی جنینی انسان. از یک بلاستوسیت انسانی در روزهای پنجم تا هفتم پس از لقاح توده سلول‌های داخلی جدا شده و روی یک لایه تغذیه کننده از سلول‌های فیبروبلاستی کشت داده می‌شوند. پس از یک تا دو هفته، رشد سلول‌ها بیشتر شده و به ظرف محیط کشت جدید منتقل می‌شوند که همراه با ظهور کلنی سلول‌های متمایز نشده است.[۱۱]

IPSها بسیاری از خصوصیات ESها را دارند به علاوه مشخص شده است که برنامه ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک باعث تغییرات ژنومی مانند تغییر در تعداد کپی‌ها و ایجاد نقاط جهش در آنها می‌شود.[۱۶] تکنولوژی برنامه ریزی مجدد سلول‌ها در حوزه درمان تخصصی بیماران و توانایی برای تولید سلول‌های بنیادی ویژه یک بیماری در محیط *in vitro* علاقمندان زیادی را به خود جلب کرده است.[۲۰] یک حوزه مهم دیگر IPSها توانایی آنها برای دستکاری‌های ژنتیکی ثابت و مستقل شونده به نسل‌های بعدی برای مطالعات ژنها است.[۱۶]

سلول‌های بنیادی بالغین یا سلول‌های بنیادی بافتی اختصاصی قدرت محدودی دارند زیرا می‌توانند سلول‌هایی را تولید کنند که از آن منشا گرفته اند.[۱۳] برای مثال سلول‌های بنیادی مشتق از سلول‌های عصبی به سلول‌های آستروسیت، الیگودندریسیت یا نورون‌ها متمایز می‌شوند.[۱۳] سلول‌های بنیادی بالغین در *In vitro* قابلیت محدود در دوباره سازی خود را دارند.

کاربرد سلول‌های بنیادی در کشف داروها

سلول‌های بنیادی در حوزه کشف دارو و مطالعات سم شناسی کاربرد دارند.[۱۲و۱۷]

۱- شناخت هدفمند

به واسطه تمایز سلول‌های بنیادی به یک گروه خاصی از سلول‌ها در آزمایشگاه امکان مطالعه الگوی بیان ژنها و بررسی مکانیسم مولکولی ژنها و امکان شناسایی پروتئین‌های احتمالی در درمان فراهم می‌شود. همه این موارد به همراه تغییرات در ژنها مطالعات را گسترده تر کرده است و استفاده از روش‌های مولکولی به تشخیص دقیق تر و بهتر بیماری‌ها منجر شده است و تشخیص دقیق ترسرطان‌ها را فراهم نموده است.[۴،۲۱و۲۲] توانایی تولید سلول‌های بنیادی القایی خاص می تواند ما را از نحوه پیشرفت بیماری و پاتولوژی آن بیماری مطلع سازد.[۹]

۲- غربالگری در مقیاس زیاد

متد رایج در غربالگری داروی استفاده از سلول‌های نوترکیبی است که دارای ژن خاصی هستند سلول‌های اولیه یا Primary cells می‌توانند برای این منظور مفید باشند، اما خیلی کم یافت می‌شوند و تعداد دفعات محدودی قبل از پیری و مرگ می‌توانند پاساژ داده شوند.[۱۲] همچنین تنوع در دهنده‌های سلولی باعث بروز نتایج غیر قابل تکرار می‌شود. لذا سلول‌های بنیادی بهتر از سلول‌های اولیه و نوترکیب عمل می‌کنند چرا که خیلی زیاد تکثیر می‌یابند و می‌توانند فریز و ذخیره گردند و سپس متمایز به سلول‌های مورد نظر شوند.[۲۳] بعلاوه IPS می‌توانند به سلول‌های سوماتیک اختصاصی بیماری تبدیل شوند و هم چنین پانلی از سلول‌های بنیادی با فنوتیپ ژنتیکی متنوع تولید کنند.[۲۴و۲۵]

بصورت کاربردی دکتر Pfizer سلول‌های بنیادی جنینی موش را به سلول‌های عصبی متمایز کرد که گیرنده ۲-آمینو، ۳- پروپیونیک اسید (AMPA) را بیان می‌کرد که به ترکیبات استاندارد AMPA پاسخ مناسبی داشت. بعدها کاربرد انتخاب یک کلون سلولی بکار گرفته شد. بدین ترتیب یک ژن برای مقاومت دارویی که تحت کنترل پروموتور ژن SOX-1 بود (مخصوص رده سلول عصبی) وارد سلول شد تا بتواند در طول تمایز سلول‌های بنیادی جنینی، از روش انتخاب دارویی استفاده کند و پایدار بماند و سلول‌هایی که ژن مقاومت را بیان نمی‌کردند، بمیرند. این یک تکنیک قوی برای انتخاب سلول‌های متنوع و متمایز شده می‌باشد.[۱۱] این مسئله سبب شده تا شرکت‌های دارویی برای استفاده از ESC در اهداف دارویی با دانشگاه‌ها تبادلات علمی داشته باشند.[۱۱]

۳- الگوبرداری از بیماری‌ها

سلول‌های بنیادی می‌توانند به سلول‌های سوماتیک اختصاصی بیماری تبدیل شوند که در مورد نحوه تاثیر دارو در آن بیماری مورد مطالعه قرار بگیرند. تا قبل از تکنولوژی سلول‌های بنیادی از مدل‌های حیوانی و سلول‌های بیماران برای الگوبرداری از بیماری استفاده می‌شد. اما امروزه از IPS سلول‌های فرد بیمار که توانایی تولید رده‌های سلولی اختصاصی مختلف و تبدیل به سلول سوماتیک را دارند استفاده می‌شود. مثلا در سندرم مادرزادیQTهای بلند و نامنظم ضربان قلب که موتاسیون در کانال پتاسیم دارند، این سلول‌های IPS به سلول‌های عملکردی قلبی متمایز می‌شود تا علت پتانسیل‌های طولانی مدت بافت مورد نظر بهتر بررسی شود.[۲۶] همچنین IPSها در بیماری هانتینگتون، نقص ایمنی شدید، دیابت جوانان، بیماریهای قلبی-عروقی و بیماری آتروفی نخاعی-

عضلانی(Spinal Muscular Atrophy=SMA) مورد بررسی قرار گرفته است.[۲۴]

یکی از مشکلات این روش این است که برای مثال در بیماری آلزایمر آیا امکان دارد که استفاده از این سلول‌ها سیر پیشرفت بیماری را کندتر کند و آیا آنها میتوانند در جهت سلولی متمایز شوند که عملکرد طبیعی سلول‌های نرمال را در داخل بافت انجام دهد؟ در نتیجه فعلا بیماریهای که فقط یک نوع خاص سلولی را درگیر می‌کنند می‌توانند از این روش استفاده کنند.[۲۶و۲۷] برخی از مراکز بر روی استفاده از IPS های اختصاصی در کشف داروها و تولید پنلی از IPS برای بررسی مشکلات نورولوژیکی، بیماری عصبی، قلبی و پارکینسون فعالیت می‌کنند.[۱۱]

۴- داروهای تحریک کننده تکثیر و رشد

علاوه از کاربرد سلول‌های بنیادی در غربالگری دارویی، آنها دارای پتانسیل خوبی برای تولید داروهای جدید و فاکتورهایی برای تحریک داخل سلولی برای تکثیر بافت در جهت جبران سلول‌های بیمار می‌باشند (مثلا در سکته قلبی یا مغزی).[۲۷] یک سری داروهای محرک رشد موجود هستند: مثلا اریتروپوتئین و مولکول کوچک الترومبوپگ (Eltrombopage) که محرک رشد گلبولهای قرمز و پلاکت‌ها از رده‌های هموپوئیتیک هستند. الترومبوپگ یک اگونیست گیرنده ترومبوپوئیتین (TPO) است که با استفاده از غربالگری سلولی در یک رده سلولی نوترکیب که گیرنده TPO را بیان می‌کردند کشف شد. بررسی این عوامل از طریق شناخت گیرنده‌ها و سایتوکاین‌ها میسر می‌باشد.[۲۸] اما برای بیشتر بافتها چنین اطلاعاتی در دسترس نیست.[۲۸]

یک راه دیگر اینست که خود سلول‌های بنیادی و سلول‌های مولد (Progenitor cells) روی خودشان تاثیر بگذارند تا تحریک به رشد و تکثیر کنند. بسیاری از بافتهای بالغین حاوی سلول‌های بنیادی هستند و در مواردی که بتوان آنها را جدا کرد، آنها می‌توانند وسیله خوبی برای غربالگری دارویی و محرک‌های رشد و تکثیر باشند.[۹] برای مثال سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌توانند هدف بیش از هزار نوع ملکول قرار بگیرند که در جهت استخوان سازی تحریک شوند. برای استخوان سازی ترکیبات ۳۶ گانه‌ای در استئوژنز موثر هستند که به عنوان ترکیب مهم در رشد دوباره استخوان موثر می‌باشد. اما برای همه بافتها چنین سلول‌هایی یافت نشده یا به مقدار کافی شناخته نشده است.[۱۱]

روش دیگر توسعه و رشد سلول‌های بنیادی بالغین یا سلول‌های مولد (پروژنیتور) در آزمایشگاه می‌باشد که این اساس تکنولوژی آزمایشگاه‌ها (Progenitor lab) می‌باشد که باعث به وجود آمدن پیش سازهایی مرتبط با استم سل‌ها می‌شود.[۱۷و۱۹] این سلول‌ها می‌توانند برای مطالعه ملکول‌های کوچک که در تمایز نهایی پروژنیتورها نقش دارند مورد استفاده قرار گیرند.[۱۹] اخیرا بسیاری از مراکز بدنبال کشف سلول‌های کوچک دارویی هستند که باعث تمایز سلول‌های بنیادی بالغین در آزمایشگاه می‌شود.[۱۴]

مهم‌ترین ضرورت برای بکار گرفتن سلول‌های بنیادی قابلیت و قدرت تمایز آنها به سلول‌های مورد نظر و قابل اعتماد بودن آنها و تکثیر کافی و خلوص زیاد می‌باشد که این کارها از لحاظ تکنیکی ساده نیستند و برای همین علت سلول‌های بنیادی در داروسازی زیاد نتوانسته‌اند عملا بکار گرفته شوند.[۲۴و۲۵] تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بالغ نیاز به مراحل کشت متوالی و اضافه کردن مداوم فاکتورهای رشد و فاکتورهای لازم دارد.[۸] بعلاوه سوبسترای ماتریکس سلولی نیز مهم می‌باشد.[۵و۶] قرارگیری سلول‌ها از لحاظ فضایی و موقعیت سلول‌ها در محیط باعث تاثیرات زیادی در سرنوشت آنها شود و کنترل تمام این مسایل مستلزم صرف وقت و هزینه زیاد است.[۲۹] به علاوه تولید در سطوح بالا به مقدار زیاد نیازمند شرایط استاندارد است یعنی محیطی که احتیاج به سرم نداشته و نیاز به تغذیه کننده سلولی نباشد.[۵]

مطالعات سم شناسی

۳۰ درصد همه داروهای تحت آزمایشات بالینی در مراحل اولیه کنار گذاشته می‌شود که عمدتا بدلیل اثرات سمی روی کبد یا قلب است که هزینه گزافی برای تولید کننده دارد و بیانگر اینست که مدل‌های پاراکلینیکی سم شناسی غیر موثر می‌باشند.[۱۲] سلول‌های کبدی و قلبی اولیه (primary cells) به همراه مدل‌های حیوان و رده سلول‌های نوترکیب برای تست‌های سم شناختی در آزمایشگاه استفاده می‌شوند.[۱۷و۳۰] اما سلول‌های اولیه کبدی گران و کمیاب هستند و از دهنده‌ای به دهنده‌ای دیگر خیلی متغیر می‌باشند.[۲۸] از طرفی رده سلول‌های نوترکیب و مدل حیوانی نمی‌توانند مثل کبد انسان عملکرد داشته باشد.[۲۶] از اینرو سلول‌های بنیادی پر توان

مـی‌تواننـد منبـع غیرمحـدودی بـرای سـلول‌هـای کبـدی و قلبـی باشند.[۱۷و۲۰]

IPSها جایگاه ویژه‌ای دارند چون به آسانی از هر کس می‌توانند گرفته شوند و سیستم خوبی برای تولید سلول‌هایی هستند که بتـوان تاثیرات داروها را در جهت‌های متفاوت مطالعـه کـرد.[۳] سـلول‌هـای بنیادی متمایز شده به هپاتوسیت‌ها بسیار توانمند هسـتند، زیـرا مـی توانند یک ارگان کبدی کامل را ایجاد کنند که در بیماری‌های شدید کبدی مورد استفاده قرار گیـرد و از طرفـی بـرای کشـف داروهـای جدید در جهت مطالعات توکسیسیتی و متابولیسـمی مـورد اسـتفاده قرار گیرند.[۲۶] گر چه سلول‌های پرایمری کبدی انسـانی در دسـترس هستند اما آنهـا خیلـی زود عملکـرد خـود را در محـیط *In vitro* از دست میدهند و غیر قابل استفاده می‌شوند کـه ایـن مسـئله یکـی از محدودیت‌های آنهاست.[۲۰] رده‌های سلولی هپاتوسـیت در دسـترس، سطح بسیار کمـی از آنـزیم‌هـای متـابولیزه کننـده را دارنـد و فاقـد بسیاری از پروتئین‌هـای مهـم هسـتند کـه سـبب اخـتلاف آنهـا بـا هپاتوسیت‌های اصلی می‌شود.[۱۱و۳۱]

برخی افراد از HESها استفاده کردنـد کـه بـه سـلول‌هـای شـبه هپاتوسیت تبدیل می‌شوند که فنوتیپی شبیه هپاتوسیت دارد. اما ایـن سلول‌ها بر خلاف سلول‌های هپاتوسیت، آنزیم‌های سیتوکروم P450 را خیلی زیاد بیان می‌کنند که مطالعات سم شناختی در آنهـا مشـکل است.[۲۶] البته موفقیت‌هایی با تولید سلول‌های کاردیوسیت از HES و IPSها بدست آمده است.

سیستم‌های اتوماتیک کشت

چندین روش از سیسـتم‌هـای اتوماتیـک کشـت سـلولی بـرای غربالگری و مشاهده شـرایط متنـوع تمـایز در چاهـک‌هـای متنـوع استفاده شده است که جداسازی آنها نیز بصـورت اتوماتیـک فـراهم می‌شود.[۲۵] تاکنون بصورت اتوماتیک ۲۹۰۰ ترکیب را بررسی کردنـد که بر روی تکثیر خودی و تمایز در HES سـل‌هـا تـاثیر دارنـد. ۱۰ ترکیب اصلی در بین آنها موثرتر می‌باشد که پـنج نـوع آن در تمـایز نقش دارند که عبارتنـد از : رتینوئیـک اسـید، سـلگلین، سـایمرین، سارمنتوژنین که کاملا در تمایز سلول‌ها به رده دیگـر سـلولی مـوثر هستند.[۱۱و۳۲]

ظروف کشت، محیط کشـت، مـواد مغـذی سـلول‌هـا، سـطوح چسبندگی سلول‌ها و غیره همه می‌توانند موثر باشند.[۲۴]

سیستم‌های میکرواری و میکروفلوئیدیک کشت

یک روش دیگر بررسی کشت سلولی با استفاده از تکنیک‌هـای ریز دست ساخت/میکروسازه (Microfabrication) است. این روش باعث می‌شود که بسیاری از آزمایش‌ها بصورت موازی به جلـو رود و در هزینه صرفه جویی شده و امکـان بررسـی رفتـار یـک سـلول واحد در یک مجموعه کامل فراهم شود.[۱۱] این روش بـرای مطالعـه تاثیرات متقابل بین ارتباط سلول‌های بنیادی و فاکتورهای سلولی در محـیط‌هـای بسـیار کوچـک بـه کمـک یـک ربـات در پلیـت‌هـای میکرواری بکار برده می‌شود. فاکتورهای خارج سـلولی متفـاوت در ترکیبات مختلف به میکرواری‌ها وارد مـی‌شـود و مطالعـه همزمـان ده‌ها یا صدهای محیط کشت را قادر می‌سازد.[۲۳]

تکنولوژی میکروفلوئیدی باعث تسریع تغییرات در محیط کشت می‌شوند که این تغییرات در زمانی که ما می‌خواهیم انجام می گردد. همچنین مطالعه امبریونیک سلول‌ها و انجام میکرفلوئیدها در کشـت سـلولی سـه بعـدی و تـاثیر آن‌هـا در سرنوشـت سـلولی را فـراهم می‌کند.[۳۳]

کشت سلولی ترکیبی (Combinatorial)

خصوصیت تمایز سلول‌های بنیادی به طور متوالی باعث ایجـاد روش کشت ترکیبی گردیده است که مشـاهده هـزاران پروتکـل در یک آزمایش را امکان پذیر می‌سازد.[۳۰و۳۳] استفاده از حاملین کوچـک (Microcarrier) سبب تکامـل ایـن روش شـده اسـت. سـلول‌هـای بنیادی روی میکرو حامـل‌هـای بیـدی در روی چنـد محـیط تمـایز سلولی کشت داده می‌شوند.[۱۱و۳۴]

پروسه متوالی کشت و پاساژ یا به عبارتی تقسیم بندی استخری (split-pool) باعث بررسی مرحلـه بـه مرحلـه همـه انـواع ترکیبـات ممکن و کشت‌های متنوع و حتی بررسی تک سلول مـی‌شـود.[۳۳] بـه هر محیط کشت یک تگ یا برچسب رنگـی وارد مـی‌شـود کـه بـه حاملین کوچک یا کریرها وصل می‌شود. در پایان رشته‌های حاصـل سلول‌های تمایز یافته بوسیله روش‌های غربالگری مثل رنگ آمیـزی

ایمونولوژیک سنجش می‌شوند و هر رشته مثبت حاوی سلول‌های بنیادی بصورت اتوماتیک جدا می‌شود و بصورت مشخص در هر غربالگری ۱۰۰ تا رشته مثبت جدا می‌گردد. این سیستم باعث ایجاد یک روش جدید و موفق برای بیشتر سلول‌های بنیادی مثل هپاتوسیت‌ها، نورون‌ها، کاردیومیوسیت‌ها و استئوبلاست‌ها شده است. به علت اینکه شرایط متعدد در هر غربالگری تست می گردد، و یا حتی استفاده از microRNA ها در سلولهای بنیادی و درمان بسیاری از بیماریهای قلبی و سرطانها پروتکل‌های بسیار بهتری کشف می‌شود که به روش‌های قدیمی‌تر ارجح هستند. [۱۱و۳۸-۳۵]

نتیجه و بحث

کلیه روش‌های درمانی کنونی دارای مزایا ومعایب خاصی هستند ولی امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی با توجه به قرابت ژنتیکی کامل با سلول‌های فرد توسعه روش‌های درمانی جدید را در برداشته است. خصوصیات بسیار جالب و متنوع سلول‌های بنیادی پتانسیل وقابلیت فوق‌العاده ای ازآنها را ایجاد کرده است. ظهور سلول‌های بنیادی در پزشکی، صنعت داروسازی در حوزه تعیین هدف دارو و سم شناسی امکان بسیاری از روش‌های درمان را امکان‌پذیر ساخته است. در سالیان اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در روش‌های کشت و جدا سازی سلول‌های بنیادی فراهم شده است، اما امروزه بکارگیری همه جانبه سلول‌های بنیادی در پزشکی و کشف داروها بستگی به توسعه علمی قوی و کشت سلولی قابل تکرار و قابل تعیین مسیر رده سلولی دارد. همچنین کشف و استاندارد کردن پروتکل‌های تمایز سلولی که با متغیرهای زیادی در ارتباط است مهم می‌باشد. برای مثال چه زمانی، چه ملکولی و چه سوبسترای برای تغییرات سه بعدی سلولی لازم است. لذا استفاده از روش‌های ترکیبی و چندین روش شرح داده شده می‌تواند در توسعه و صنعتی کردن و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های بالغ و کاربرد آنها در فاز بالینی و تحقیقاتی موثر واقع شود.

References

1. Gulotta LV, Chaudhury S, Wiznia D. Stem cells for augmenting tendon repair. Stem cells international. 2012; 291-431.
2. Améen C, Strehl R, Björquist P, Lindahl A, Hyllner J, Sartipy P. Human embryonic stem cells: Current technologies and emerging industrial applications. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2008;65(1):54-80.
3. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. Regenerative medicine. 2010 Jan;5(1):121-43.
4. Buecker C, Geijsen N. Different flavors of pluripotency, molecular mechanisms, and practical implications. Cell Stem Cell. 2010 Nov 5;7(5):559-64.
5. Van der Jeught M, Taelman J, Duggal G, Ghimire S, Lierman S, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Application Of Small Molecules Favoring Naive Pluripotency during Human Embryonic Stem Cell Derivation. Cell Reprogram. 2015 Jun;17(3):170-80.
6. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. Cell Stem Cell. 2009;5(1):17-26.
7. Yin Z, Chen X, Chen JL, Ouyang HW. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration. Expert opinion on biological therapy. 2010 May;10(5):689-700.
8. Chen Y, Lai D. Pluripotent states of human embryonic stem cells. Cell Reprogram. 2015 Feb;17(1):1-6.
9. Cezar GG. Can human embryonic stem cells contribute to the discovery of safer and more effective drugs? Current Opinion in Chemical Biology. 2007;11(4):405-9.
10. Jensen J, Hyllner J, Bjorquist P. Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. Journal of cellular physiology. 2009 Jun;219(3):513-9.
11. Hook LA. Stem cell technology for drug discovery and development. Drug Discov Today. 2012 Apr;17(7-8):336-42.
12. Pouton CW, Haynes JM. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Dec 12;57(13):1918-34.
13. Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. Current Opinion in Cell Biology. 2006;18(6):704-9.
14. Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. Clin Pharmacol Ther. 2011 May;89(5):655-61.

15. Chamling X, Sluch VM, Zack DJ. The Potential of Human Stem Cells for the Study and Treatment of Glaucoma. Investigative ophthalmology & visual science. 2016 Apr 1;57(5):ORSFi1-6.

16. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011;471(7336):68-73.

17. Pouton CW, Haynes JM. Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2007 Aug;6(8):605-16.

18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006;126(4):663-76.

19. Van der Jeught M, O'Leary T, Duggal G, De Sutter P, Chuva de Sousa Lopes S, Heindryckx B. The post-inner cell mass intermediate: implications for stem cell biology and assisted reproductive technology. Hum Reprod Update. 2015 Sep-Oct;21(5):616-26.

20. Chun YW, Voyles DE, Rath R, Hofmeister LH, Boire TC, Wilcox H, et al. Differential responses of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to anisotropic strain depends on disease status. J Biomech. 2015 Nov 5;48(14):3890-6.

21. Mansouri F. The role of the clinical and molecular assays in prostate cancer detection. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2017;10(6):11-5.

22. Mojarrad M, Momeny M, Mansouri F, Abdolazimi Y, Tabrizi MH, Ghaffari SH, et al. Autocrine human growth hormone expression leads to resistance of MCF-7 cells to tamoxifen. Med Oncol. 2010 Jun;27(2):474-80.

23. Trosko JE, Chang CC. Factors to consider in the use of stem cells for pharmaceutic drug development and for chemical safety assessment. Toxicology. 2010 Mar 30;270(1):18-34.

24. Welling M, Geijsen N. Uncovering the true identity of naive pluripotent stem cells. Trends Cell Biol. 2013 Sep;23(9):442-8.

25. Chen A, Ting S, Seow J, Reuveny S, Oh S. Considerations in designing systems for large scale production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells. Stem cell research & therapy. 2014;5(1):12.

26. Sartipy P, Björquist P, Strehl R, Hyllner J. The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery. Drug Discovery Today. 2007;12(17–18):688-99.

27. Ebert AD, Svendsen CN. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2010 May;9(5):367-72.

28. Erickson-Miller CL, DeLorme E, Tian S-S, Hopson CB, Stark K, Giampa L, et al. Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. Experimental Hematology. 2005;33(1):85-93.

29. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. Journal of Biomechanics. 2010;43(1):55-62.

30. Azarin SM, Palecek SP. Development of scalable culture systems for human embryonic stem cells. Biochemical Engineering Journal. 2010;48(3):378-84.

31. Lin C, Ballinger KR, Khetani SR. The application of engineered liver tissues for novel drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2015 May;10(5):519-40.

32. Miryounesi M, Nayernia K, Diantpour M, Mansouri F, Modarressi M H. Co-culture of mouse embryonic stem cells with sertoli cells promote in vitro generation of germ cells. IJBMS. 2012.

33. Sun B, Yu W, Wang F, Song W, Jin H, Sun Y. Effects of group culture on the development of discarded human embryos and the construction of human embryonic stem cell lines. Journal of assisted reproduction and genetics. 2014 Oct;31(10):1369-76.

34. Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, Ware BR. Microengineered liver tissues for drug testing. J Lab Autom. 2015 Jun;20(3):216-50.

35. Gholikhani-Darbroud R, Khaki-Khatibi F, Mansouri F, et al. Decreased circulatory microRNA-4478 as a specific biomarker for diagnosing non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) and its association with soluble leptin receptor. Bratisl Lek Listy. 2017;118(11):684-90.

36. Ashtiani Z, Mansouri F. Overview of Medical Genetics and Common disorders of hearing and speech. Tehran: Nashr Da; 2015.[In Persian]

37. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):73-7.

38. Mansouri F, Farzaneh P, Fazeli A. Collection and culture of dental pulp stem cell, Medical genetics congress, Tehran, IRAN,2013.